

25.6.2004

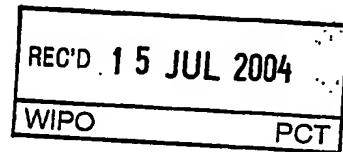
日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 4月21日
Date of Application:

出願番号 特願2003-116157
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-116157]



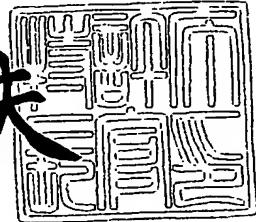
出願人 株式会社資生堂
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願
【整理番号】 1025172
【提出日】 平成15年 4月21日
【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明の名称】 角層における酸化タンパク質の評価方法
【請求項の数】 27
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂
リサーチセンター（新横浜）内
【氏名】 藤田 宏志
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂
リサーチセンター（新横浜）内
【氏名】 平尾 哲二
【特許出願人】
【識別番号】 000001959
【氏名又は名称】 株式会社資生堂
【代理人】
【識別番号】 100077517
【弁理士】
【氏名又は名称】 石田 敬
【電話番号】 03-5470-1900
【選任した代理人】
【識別番号】 100092624
【弁理士】
【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100117019

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 陽一

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9102971

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 角層における酸化タンパク質の評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記検出を蛍光顕微鏡下で行う、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記蛍光顕微鏡により得た検出結果を画像化する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる、請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項7】 前記蛍光標識アビジンがフルオレセイン標識アビジンである、請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、かかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項9】 前記角層試料が皮膚に対するテープストリッピングにより採

取されたテープ角層である、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

【請求項10】 角層酸化タンパク質の角層上での存在を二次元的に評価する方法に利用するためのキットであって、

テープストリッピングにより角層試料を採取するための粘着テープ；及び酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質；を含んで成ることを特徴とするキット。

【請求項11】 前記評価が蛍光顕微鏡下で行われる、請求項10記載のキット。

【請求項12】 前記蛍光顕微鏡により得た検出結果が画像化される、請求項11記載のキット。

【請求項13】 前記蛍光物質がヒドラジノ基含有蛍光物質であり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項10～12のいずれか1項記載のキット。

【請求項14】 前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる、請求項13記載のキット。

【請求項15】 前記蛍光物質が蛍光標識アビジンであり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する、請求項10～12のいずれか1項記載のキット。

【請求項16】 前記蛍光標識アビジンがフルオレセイン標識アビジンである、請求項15記載のキット。

【請求項17】 前記蛍光物質が蛍光標識抗体であり、前記酸化タンパク質の蛍光物質による特異的な蛍光標識が、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、かかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する、請求項10～12のいずれか1項記載の

キット。

【請求項 18】 皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法。

【請求項 19】 前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】 前記ヒドラジノ基含有蛍光物質がフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】 前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する、請求項 18 記載の方法。

【請求項 22】 前記蛍光標識アビジンがフルオレセイン標識アビジンである、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】 前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識が、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、かかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する、請求項 19 記載の方法。

。

【請求項 24】 更に、前記コーニファイドエンベロープの疎水性領域を選択的に染色できる色素で染色して検出する及び／又は当該コーニファイドエンベロープの抗原性を検出することを含んで成る、請求項 18～23 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項25】 前記色素がナイルレッドである、請求項24記載の方法。

【請求項26】 前記抗原性が抗ヒトインボルクリン抗体を使用して検出される、請求項24記載の方法。

【請求項27】 前記検出を蛍光顕微鏡で行う、請求項18～26のいずれか1項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、酸化タンパク質を特異的に蛍光標識することを特徴とする方法、及びその方法を実施するために利用されるキットを提供する。本発明は更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコニファイドエンベロープの酸化形態を検出する方法にも関連する。

【0002】

【従来の技術】

肌質（または皮膚の状態）を的確に把握することは、より健康な皮膚を維持するための的確なスキンケアをする上で重要である。そのため、化粧品によるスキンケアを実施するに際し、例えば、美容技術者による問診などを通じて、化粧品の使用者の肌質が評価されてきた。また、肌質の客観的な評価を目的として、各種の計測機器を使用して、観察又は測定されるパラメーターにより、皮膚の状態または機能を評価することも行われている。

【0003】

近年、皮膚の加齢に伴う老化や光老化との関係で、角層酸化タンパク質の研究が盛んに行われている。酸化タンパク質とは、酸化を受けた結果カルボニル基の導入されたタンパク質をいい、一般に、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のNH₂基が直接酸化されてカルボニル基となった結果生成されたものと、脂質が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで生成されたものとがある。酸化タンパク質は老化関連での研究が豊富にされており、加齢（脳、肝、線維芽細胞）、

アルツハイマー病、早老症（Werner症候群）等において増加することが認められている。

【0004】

皮膚においては、皮膚表面の皮脂がフリーラジカルによって酸化し、過酸化脂質が生成することでタンパク質の酸化は開始されるものと考えられる。いったん過酸化脂質が生成されると、酸化は連鎖的に進行し、肌表面に刺激を与えるだけにとどまらず、角質層の奥まで入り込んで細胞にダメージを与える。このようにして、皮脂、皮膚タンパク質の酸化は肌本来がもつうるおい、はり、明るさ等を保つ機能をことごとく低下させると考えられる。従って、表皮の酸化タンパク質の性状、例えば存在量、分布状態等を評価することは、肌質または皮膚の状態を的確に把握し、その後のスキンケア法の方針決定や化粧品の選定のために極めて重要であるものと考えられる。

【0005】

前述の通り、角層酸化タンパク質に関する研究が多々行われている。J.J.Thiele et al. FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406には、角層酸化タンパク質の検出方法が記載されている。それには、粘着テープを皮膚表層に貼付け、剥がすといったいわゆるテープストリッピング操作を行うことで角層の付着したテープ（「テープ角層」）を獲得し、酸化タンパク質をELISAにて検出する方法が開示されている。Thieleらによれば、テープ角層に紫外線照射を施したところ、酸化タンパク質の増加が認められ、また酸化タンパク質の存在量は、上腕等の非露光部角層よりも顔面等の露光部角層において多い、とのことである。

【0006】

J.J.Thiele et al. J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359においては、テープ角層からタンパク質抽出を行い、可溶性成分をDNPH標識し、SDS-PAGEにかけ、抗DNP抗体を用いてウェスタンプロットを行うことで酸化タンパク質の検出を行っている。それにおいては、酸化タンパク質は角層の中層や下層よりも上層において多く存在することが報告されている。

【0007】

C.S.Sander et al. J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625にお

いては、ヒト皮膚組織切片をDNPHで標識し、抗DNPで染色することで酸化タンパク質の検出を行っている。それにおいては、光老化皮膚では主に真皮において酸化タンパク質の量が増大することが認められ、また、紫外線を連日照射することで角層酸化タンパク質の量が増加し、またその増加の割合は紫外線の照射量に依存して増大することが報告されている。

【0008】

このように、角層酸化タンパク質に関する研究は盛んに行われ、皮膚の加齢による老化、紫外線照射などによる光老化との関連性も示唆されている。従って、皮膚の酸化タンパク質の性状の評価は、皮膚老化の予防又は改善を目的とする適切なスキンケア法、治療法、化粧品、医薬品の選定などのために有効な情報を提供するものと予想される。

【0009】

従来技術における酸化タンパク質の検出はいずれも角層試料を採取し、タンパク質抽出に付し、そのタンパク質抽出物にDNPHを作用させて酸化タンパク質をDNPで標識し、SDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に転写し、抗DNP抗体を作用させてからパーオキシダーゼ標識二次抗体を結合させ、そしてケミルミネッセンス試薬（ECL基質）で発色させるといった手間暇のかかる工程を包含するものであった。しかも、得られる情報は酸化タンパク質の量に関するものに限られ、それが肌上でどのように分布し、顕在化しているかといった二次元的な詳細な情報は一切提供しないものであった。従って、酸化タンパク質の検出は肌質の評価に有用であると示唆されているにもかかわらず、その操作が面倒であり、また得られる情報も限られる、などといった理由であまり活用されるものではなかった。しかしながら、その簡易化が図られ、またその情報内容もより詳細なものとなれば、例えば近年における化粧品業界などで行われている適切なスキンケア法などのアドバイスを目的とするカウンセリングサービスの提供のための有力な手段ともなり得るものと考えられる。

【非特許文献1】

FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406

【非特許文献2】

J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359

【非特許文献3】

J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625

【非特許文献4】

Analytical Biochemistry 1987, 161, 245-257

【特許文献1】

特開2001-91514号公報

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、特に化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用を図ることを可能とすることを課題とする。従来において、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を獲得しようとする試みは全くもってなされていなかった。

【0011】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。好ましくは、前記検出は蛍光顕微鏡下で行われる。更に好ましくは、前記蛍光顕微鏡により得た検出結果は画像化される。

【0012】

好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にヒドロジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドロジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドロジドから成る群から選ばれる。

。

【0013】

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光

標識は、前記酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

【0014】

別の好適な態様において、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、かかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

【0015】

好ましくは、前記角層試料は皮膚に対するテープストリッピングにより採取されたテープ角層である。

【0016】

本発明は更に、角層酸化タンパク質の角層上での存在を二次元的に評価する方法に利用するためのキットであって、

テープストリッピングにより角層試料を採取するための粘着テープ；及び酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識するための蛍光物質；を含んで成ることを特徴とするキットを提供する。好ましくは、前記評価は蛍光顕微鏡下で行われる。更に好ましくは、前記蛍光顕微鏡により得た検出結果は画像化される。

【0017】

好適な態様において、前記蛍光物質はヒドラジノ基含有蛍光物質であり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる。

別の好適な態様において、前記蛍光物質は蛍光標識アビジンであり、前記酸化タンパク質のカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にビオチ

ンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

【0018】

別の好適な態様において、前記蛍光物質は蛍光標識抗体であり、前記酸化タンパク質の蛍光物質による特異的な蛍光標識は、前記酸化タンパク質にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、しかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

【0019】

本発明は更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。

【0020】

好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにヒドラジノ基含有蛍光物質を作用・結合させることにより実施する。好ましくは、前記ヒドラジノ基含有蛍光物質はフルオレセイン-5-チオセミカルバジド及びテキサスレッドヒドラジドから成る群から選ばれる。

【0021】

別の好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにビオチンヒドラジドを作用・結合させ、次いでそれに蛍光標識アビジンを作用・結合させてビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの複合体を形成させることにより実施する。好ましくは、前記蛍光標識アビジンはフルオレセイン標識アビジンである。

【0022】

別的好適な態様において、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基の特異的な蛍光標識は、前記酸化形態のコーニファイドエンベロープにジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、次いでそれに抗ジニトロフェニル抗体を作用・結合させ、かかる後それに当該抗ジニトロフェニル抗体に特異的な蛍光標識抗体を作用・結合させることにより実施する。

【0023】

更に好ましくは、前記方法は、前記コーニファイドエンベロープの疎水性領域を選択的に染色できる色素で染色して検出する及び／又は当該コーニファイドエンベロープの抗原性を検出することを含んで成る。好ましくは、前記色素はナイルレッドであり、前記抗原性は抗ヒトインボルクリン抗体を使用して検出される。

。

【0024】

更に好ましくは、前記検出は蛍光顕微鏡で行われる。

【0025】

【発明の実施の形態】

本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法及びその方法を実施するためのキットを提供する。本発明の方法に従えば、以降の実施例にも示す通り、酸化タンパク質の特異的な蛍光標識が可能となる。

【0026】

角層は表皮角化細胞が終末分化して形成された角質細胞と、それをとりまく細胞間脂質から構成される。角質細胞は構造タンパク質たるケラチンを主成分とし、それを包むコーニファイドエンベロープ（「角質肥厚膜」）から構成される。角層タンパク質は紫外光、化学系酸化剤、大気汚染物質などの様々な因子に対する暴露や加齢に伴い、酸化を受けた結果カルボニル基が導入される。このような酸化には、タンパク質におけるLys、Arg、Proといったアミノ酸残基のNH₂基が直接酸化されてカルボニル基となる場合と、脂質が酸化して過酸化脂質、更には分解して反応性の高いアルデヒドとなり、それがタンパク質と結合することで起こ

る場合とが考えられる。

【0027】

本発明において、皮膚由来の角層試料は、身体のいずれの部分に由来する試料でもよく、また、かような試料（組織もしくは細胞）の培養物であってもよい。該試料の由来する身体の部位または領域の典型例としては、顔面の頬、額、手甲および体幹などを挙げることができる。

【0028】

このような試料は、所謂、外科的手段等の侵襲的な方法により取得されたものであってもよいが、殊に肌質の評価を目的とする場合には、簡易さを理由に、非侵襲的な方法により皮膚から取得されるものであることが好ましい。非侵襲的な方法としては、当該技術分野で常用されているテープストリッピングや擦過法等を挙げることができる。

【0029】

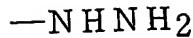
テープストリッピングは、皮膚表層に粘着テープ片を貼付、剥がすことを実施することで、皮膚の二次元的状態をその粘着テープにそのまま転写させることができるために、本発明において特に好ましい。テープストリッピングによりテープ角層を採取し、裁断せずにそのままの状態で酸化タンパク質を特異的に蛍光染色すれば、実際の皮膚の二次元的性状に対応した酸化タンパク質の二次元的情報が得られることとなる。

【0030】

テープストリッピングの好ましい方法は、まず皮膚の表層を例えばエタノールなどで浄化して皮脂、汚れ等を取り除き、適当なサイズ（例えば5×5cm）に切った粘着テープ片を皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Superstrength Mailing Tape (3M社製) 等が使用できる。

【0031】

本発明において利用できる酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識する蛍光物質は、酸化タンパク質のカルボニル基に結合できるヒドラジノ基



を有するものが好ましい。そのような蛍光物質の例には、フルオレセイン-5-チオセミカルバジド、テキサスレッドヒドラジド、ルシファーイエローヒドラジド等が挙げられる。

【0032】

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のヒドラジノ基含有蛍光物質を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；
- (4) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0033】

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、ビオチンヒドラジドと蛍光標識アビジンとの組合せを用いることもできる。ビオチンヒドラジドもヒドラジノ基を有するため、タンパク質のカルボニル基に結合できる。この場合、まず酸化タンパク質にビオチンヒドラジドを結合させ、しかる後に蛍光標識アビジンをビオチン-アビジン結合を介してビオチンヒドラジドに結合させ、その結果酸化タンパク質は蛍光標識される。ビオチンヒドラジドは当業界においてよく知られ、例えばピアース社から製造販売されているものを使用することができる。また、蛍光アビジンは、例えばフルオレセインアビジンなどが使用できる。

【0034】

このようなヒドラジノ基含有蛍光物質を使用する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））

) にて十分に洗浄した後、蛍光標識アビジンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(4) 蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；

(5) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0035】

酸化タンパク質の特異的な蛍光標識は、酸化タンパク質のカルボニル基にジニトロフェニルヒドラジンを作用・結合させ、そのジニトロフェニル部分を蛍光色素で標識することで行うこともできる。従って、本発明の更なる好適な態様では、酸化タンパク質のカルボニル基に結合させたジニトロフェニルヒドラジンのジニトロフェニル部分を蛍光免疫測定法等で検出することができる。

【0036】

このようなジニトロフェニルヒドラジンを利用して蛍光標識する場合、酸化タンパク質の検出は例えば以下のようにして実施できる：

(1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；

(2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）中のジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(3) 反応終了後に適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄した後、抗DNP抗体、例えばウサギDNP抗体（ZYMED社製）の同生理溶液を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(4) 反応終了後に同生理溶液にて十分に洗浄し、上記抗DNP抗体に特異的な蛍光標識抗二次抗体、例えばフルオレセイン標識抗ウサギIg（アマシャムファルマシアバイオテク社製）等を室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；

(5) 蛍光顕微鏡にて酸化タンパク質を検出する；

(6) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0037】

本発明に係るキットは、上述の粘着テープ及び蛍光物質の他に、上述の各種評価方法の実施に必要な試薬、例えば各種緩衝剤も一緒に含んでよい。

【0038】

上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットを使用することで、酸化タンパク

質の皮膚上での二次元的性状、詳しくは存在量、存在箇所、分布状態、例えば散在しているか、局在しているか、等の様々な情報を得ることができ、しかもそれは従来必要とされていたタンパク質の抽出操作、電気泳動操作、ウェスタンブロッティング操作などを必要とせず、高価な機器として蛍光顕微鏡さえあれば実施可能となる。従って、上記の酸化タンパク質の検出方法及びキットは、肌質の評価にとって有力な情報を簡単な操作及び設備で実施できるものとし、例えば化粧品販売の店頭でも簡単に実施することが可能である。

【0039】

更に、本発明は皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープ、詳しく酸化形態のコーニファイドエンベロープ中の酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法を提供する。

【0040】

上述した通り、角質細胞は、ケラチン線維を主成分とし、それを包むコーニファイドエンベロープから構成される。コーニファイドエンベロープは、表皮角化細胞が分化するにしたがって産生される複数のコーニファイドエンベロープ前駆体タンパクが、酵素トランスクルタミナーゼにより架橋され不溶化して形成されるものである。さらに、その一部には、セラミドなどが共有結合し、疎水的な構造をとることで、前述した細胞間脂質のラメラ構造の土台を供給し角層バリアー機能の基礎を形成することが示唆されている。コーニファイドエンベロープは、皮膚組織または培養皮膚細胞などを、ドデシル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤およびメルカプトエタノールなどの還元剤を含む溶液中で煮沸し、遠心分離などの手段により可溶性成分を除去した不溶性画分を得ることにより調製できる。これを顕微鏡で形態観察することにより、その性状を評価することができる。Michelらは、角層の最外層に比較して角層の深部においては、脆弱な構造のコーニファイドエンベロープが多いことを報告している (J. Invest. Dermatol. 91:11-15, 1988)。一方、乾癬や葉状魚鱗癬などでは最外層においても脆弱なコーニファイドエンベロープが認められるとしている (Br. J. Dermatol. 122:15-21

、1990)。

【0041】

角層バリア機能、殊に、体内からの水分の蒸散や外界からの異物の混入を防ぐ機能の主体をなすと考えられている脂質とコーニファイドエンベロープとの関連性、あるいはコーニファイドエンベロープの性状が注目され、その評価方法も開示されている（特開2001-91514号公報）。しかしながら、従来技術において、コーニファイドエンベロープの酸化形態の評価に関する報告はされていなかった。上述の通りコーニファイドエンベロープもタンパク質から構成されるため、本発明に係る角層酸化タンパク質の検出方法を適用することにより、その酸化形態が同様にして検出できた。

【0042】

コーニファイドエンベロープの酸化形態の具体的な評価方法は、例えば以下のようにして実施できる：

- (1) 角層試料を、例えばテープストリッピングにより、採取する；
- (2) これに適当な緩衝液（例えば100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5））中のビオチンヒドラジドを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (3) 反応終了後に、水不溶性画分たるコーニファイドエンベロープを、水性抽出液（例えば2%のドデシル硫酸ナトリウム、20mMのジチオスレイトール、5mMのEDTAを含む0.1Mのトリス塩酸塩緩衝液（pH8.5））を加えて加熱処理し（例えば100°Cにて10分）、不溶物を遠心分離（例えば4,000g、10分間）して、コーニファイドエンベロープとして集める；
- (4) (3)の操作を任意に繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去する；
- (5) コーニファイドエンベロープ浮遊液をスライドガラスに滴下し、風乾、アセトン固定の後、適当な生理溶液（例えば緩衝液リン酸緩衝生理食塩液（PBS））にて十分に洗浄し、次に蛍光標識アビシンを室温にて数時間（例えば1時間）反応させる；
- (6) 反応終了後に同生理溶液で十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて酸化コーニファイドエンベロープを検出する；
- (7) 任意的に、蛍光顕微鏡撮影する。

【0043】

上記酸化コーニファイドエンベロープの検出方法において、任意的に、コーニファイドエンベロープ成熟形態を評価するため、疎水的領域を選択的に染色する色素による染色を行ったり、またコーニファイドエンベロープ未熟形態を評価するため、インボルクリン抗体に対する抗原性の検出を併せて実施してもよい。

【0044】

疎水性領域（特に、生物組織における）を選択的に染色できる色素としては、各種疎水性領域の染色に使用されているものが使用することができる。このような色素の具体的なものとしては、ナイルレッド（Nile Red）、オイルレッドO（Oil Red O）、スダンIII（Sudan III）を挙げることができる。特にナイルレッドを好適に使用することができる。ナイルレッドは、その還元型であるナイルブルーとの混合物であってもよい。このような混合物には、ナイルブルーの水溶液中でナイルブルーの一部が自然に酸化されてナイルレッドに転化している状態のものも包含される。

【0045】

コーニファイドエンベロープの構成タンパク質の抗原性を検出するための対象となるタンパク質としては、インボルクリン、ロリクリンなどの脂質が共有結合しするタンパク質やタンパク質間の架橋結合であるイソペプチド、シュウドインペプチドを挙げることができる。これらの抗原性は、これらのタンパク質またはペプチドに対する抗体を使用して検出することができる。検出方法は、上記タンパク質またはペプチドへの抗体の結合を検出できる方法であれば、いかなる方法であってもよいが、組織標本中の酵素、構造タンパク質などの抗原物質を標識または染色するのに使用されている蛍光抗体法が好適である。抗体の蛍光標識としては、例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）などを使用するのがよい。

【0046】

コーニファイドエンベロープの性状の評価方法によれば、例えば、抗原性の検出方法により角層試料におけるコーニファイドエンベロープのインボルクリンが有意に検出できる場合は、有意量（または識別可能な程度）までには、脂質がイ

ンボルクリンに共有結合していないか、あるいは架橋反応が十分でなく抗原性を保持していることを意味し、角層試料におけるコーニファイドエンベロープは未熟な状態にあると評価できる。逆に、例えば、インボルクリンが有意には検出できない場合には、脂質のインボルクリンへの共有結合がかなり生じているか、あるいは架橋反応が十分に進み抗原性が消失しており、コーニファイドエンベロープは成熟した状態にあると評価できる。また、例えば、ナイルレッドで強陽性に染色されるコーニファイドエンベロープが角層試料中に検出（または観察）される場合には、コーニファイドエンベロープは強靭な状態であると評価できる。逆に、ナイルレッドによる染色性に多様性が認められる場合には、コーニファイドエンベロープ形成過程にばらつきがあると評価できる。以上の評価は培養した表皮角化細胞におけるコーニファイドエンベロープ形成過程にも同様に適用できる。

【0047】

【実施例】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。

実施例1

ビオチンヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに5mMのビオチンヒドラジド（PIERCE社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にフルオレセイン標識アビジン（アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1：100容量に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡（オリンパス社BX52）にて観察した。図1にその観察像を示す。

図1に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、ビオチンヒドラジド-フルオレセイン標識アビジンにより酸化タンパク質は十分に標識され、検出可能であることが示唆された。

【0048】

実施例2

アセトン処理した角層タンパク質の評価

4人の健常人の顔面に透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取し、一人当たり三つの試料を用意した。一つの試料は30分アセトン処理を施し、他の二つの試料は処理を施さなかった（ここでアセトン処理した試料を「アセトン→標識」試料とし、他の二つは「標識のみ」又は「標識→アセトン」試料とする）。それぞれに5mMのビオチンヒドラジド（PIERCE社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にフルオレセイン標識アビシン（アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1:100に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、「標識→アセトン」試料のみアセトンで30分処理した。次いで、それぞれの試料について蛍光顕微鏡にて観察した。画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めて酸化タンパク質の量を数値化した。図2にその数値化したグラフを示す。

図2から、テープ角層をアセトン処理してもシグナル強度に有意な変化が認められないことがわかった。従って、蛍光ヒドラジドが標識するカルボニル基は、大部分が酸化タンパク質由来であり、角層に存在する過酸化脂質の割合は小さいことが示唆された。

よって、本願発明は角層中の酸化タンパク質を検出するのに極めて有利であることが示唆された。

【0049】

実施例3

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面（頬）及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに20mMのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。数値化し際しては、画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めた。図3にその観察像と数値化したグラフを示す。

図3に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、観察像からも、数値化したグラフからも、頬、即ち、露光部における酸化タンパク質の量が、上腕内側、即ち非露光部よりも多いことが明らかであり、J.J.Thiele et al. FEBS Letter 1998 Feb 6, 422(3), 403-406の見解と一致した。従って、ビオチンヒドラジド-フルオレセイン標識アビシンにより酸化タンパク質は十分に標識され、検出可能であることが明らかとなった。

【0050】

実施例4

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、これを20回繰り返し、角層最外層と20枚目の角層を採取した。これに20mMのフルオレセイン-5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。数値化し際しては、画像から背景と細胞を分離し、それぞれの平均輝度を求めた。図4にその観察像と数値化したグラフを示す。

図4に示す通り、観察像からも、数値化したグラフからも、酸化タンパク質は最外層のほうが20枚目の角層よりも多く、従って酸化タンパク質は角層上層ほど多いことが認められ、J.J.Thiele et al. J. Invest. Dermatol. 1999, Sep, 113(3), 335-359の所見と一致した。

【0051】

実施例5

テキサスレッドヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面（頬）及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに20mMのテキサスレッドヒドラジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図5にその観察像を示す。

図5に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、フル

オレセインー5-チオセミカルバジドと同様に酸化タンパク質はテキサスレッドヒドラジドによっても標識されることが明らかとなった。

【0052】

実施例6

フルオレセインー5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の検出

健常人の上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。角層の付着したテープは、UVA ($240\text{J}/\text{cm}^2$) 及びUVB ($77\text{J}/\text{cm}^2$) 照射した後に、20mMのフルオレセインー5-チオセミカルバジド（モレキュラープローブス社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図6にその観察像を示す。紫外線照射による酸化タンパク質の増加が認められ、その結果はC.S.Sander et al. J. Invest. Dermatol. 2002, Apr, 118(4), 618-625のものと一致した。

【0053】

実施例7

ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）による角層酸化タンパク質の検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに $200\mu\text{M}$ のジニトロフェニルヒドラジン（和光純薬工業（株）社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にリン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にウサギDNP抗体（ZYMED社製）のPBS溶液（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄し、フルオレセイン標識抗ウサギIg（アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1:100に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図7にその観察像を示す。

図7に示す通り、上腕内側及び顔面のいずれにおいても蛍光が観察され、ジニトロフェニルヒドラジンを用いても、ビオチンヒドラジド、フルオレセインー5-チオセミカルバジドやテキサスレッドヒドラジドと同様に、酸化タンパク質を特異的に標識できることがわかった。

【0054】

実施例8

ビオチンヒドラジドによる酸化コニファイドエンベロープの検出

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに5mMのビオチンヒドラジド（PIERCE社コニファイドエンベロープ社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後に2%のドデシル硫酸ナトリウム、20mMのジチオスレイトール、5mMのEDTAを含む0.1Mのトリス塩酸塩緩衝液（pH8.5）を加えて100℃にて10分加熱した。不溶物を、4,000g、10分間の遠心分離により集めた。さらに溶出液添加と加熱を繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去した。こうして得られた不溶物をコニファイドエンベロープとした。コニファイドエンベロープ浮遊液をスライドガラスに滴下し、風乾、アセトン固定の後、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）にて十分に洗浄し、次にフルオレセイン標識アビジン（アマシャムファルマシアバイオテク社製；PBSにて1:100に希釈）を室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図8にその観察像を示す。

図8より、酸化形態のコニファイドエンベロープ（酸化コニファイドエンベロープ）の検出が認められ、それは非露光部たる上腕内側よりも、露光部たる顔面の角層に多く存在することが認められた。

【0055】

実施例9

コニファイドエンベロープの酸化度と成熟度との同時比較

健常人の顔面及び上腕内側に、透明な粘着テープを貼付して直ちに剥がし、角層最外層を非侵襲的に採取した。これに200μMのジニトロフェニルヒドラジン（和光純薬工業（株）社製）の100mMのMES-Na緩衝液（pH5.5）を室温にて1時間反応させた。反応終了後に2%のドデシル硫酸ナトリウム、20mMのジチオスレイトール、5mMのEDTAを含む0.1Mのトリス塩酸塩緩衝液（pH8.5）を加えて100℃にて10分加熱した。不溶物を、4,000g、10分間の遠心分離により集めた。さらに溶出液添加と加熱を繰り返して、可溶性成分を徹底的に除去した。こうして得られた

不溶物をコーニファイドエンベロープとした。コーニファイドエンベロープ浮遊液をスライドガラスに滴下し、風乾、アセトン固定の後、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)にて十分に洗浄した、次に、DNP標識された酸化コーニファイドエンベロープを検出する目的でウサギ抗DNP抗体 (ZYMED社製、1μg/ml)を、同時に未熟コーニファイドエンベロープを検出する目的でマウス抗ヒトインボルクリン抗体 (NOVOCASTRA社製) を一次抗体として反応させた。余剰の抗体を洗浄により除去した後に、テキサスレッド標識抗ウサギイムノグロブリン及びFITC標識抗マウスイムノグロブリン (各々アマシャムファルマシアバイオテク社製; PBSにて1:100に希釈) を二次抗体として室温にて1時間反応させた。反応終了後にPBSにて十分に洗浄した後、蛍光顕微鏡にて観察した。図9にその観察像を示す。

また、同様にしてDNP標識された酸化コーニファイドエンベロープを、ウサギ抗DNP抗体、FITC標識抗マウスイムノグロブリン抗体により検出するとともに、ナイルレッド染色により成熟コーニファイドエンベロープを染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。図10にその観察像を示す。この図において、ナイルレッドにより赤色に染色された成熟コーニファイドエンベロープは白三角で、FITCで黄緑色に染色された酸化形態のコーニファイドエンベロープ (酸化コーニファイドエンベロープ) は黒三角で示す。

図10より、酸化コーニファイドエンベロープは非露光部たる上腕内側よりも、露光部たる顔面の角層に多く存在することが認められた。

【0056】

【発明の効果】

本発明により、皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、特に化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用が図れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ビオチンヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出結果。

【図2】

アセトン処理した角層タンパク質の評価結果。

【図3】

フルオレセイン-5-チオセミカルバジドによる角層酸化タンパク質の検出結果。

【図4】

角層最外層と内層での酸化タンパク質の比較結果。

【図5】

テキサスレッドヒドラジドによる角層酸化タンパク質の検出結果。

【図6】

紫外線照射と酸化タンパク質量との関係。

【図7】

ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) による角層酸化タンパク質の検出結果。

【図8】

ビオチンヒドラジドによる酸化コーニファイドエンベロープの検出結果。

【図9】

コーニファイドエンベロープの酸化度と抗インボクリン抗体を利用して検出した成熟度との同時比較。

【図10】

コーニファイドエンベロープの酸化度とナイルレッドを利用して検出した成熟度との同時比較。

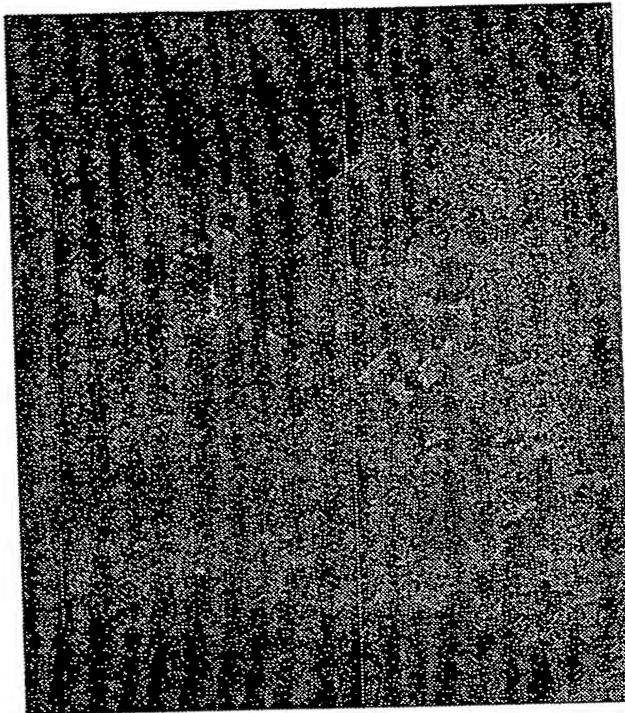
【書類名】

図面

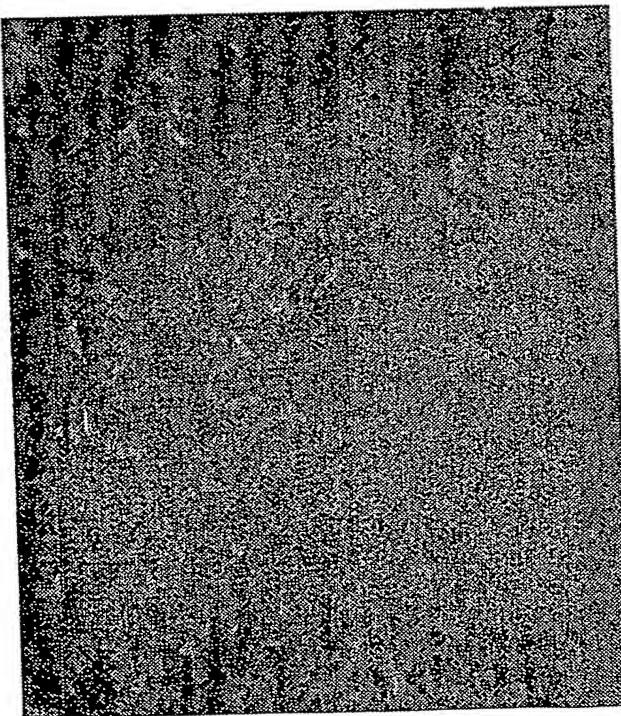
【図1】

図 1

顔面

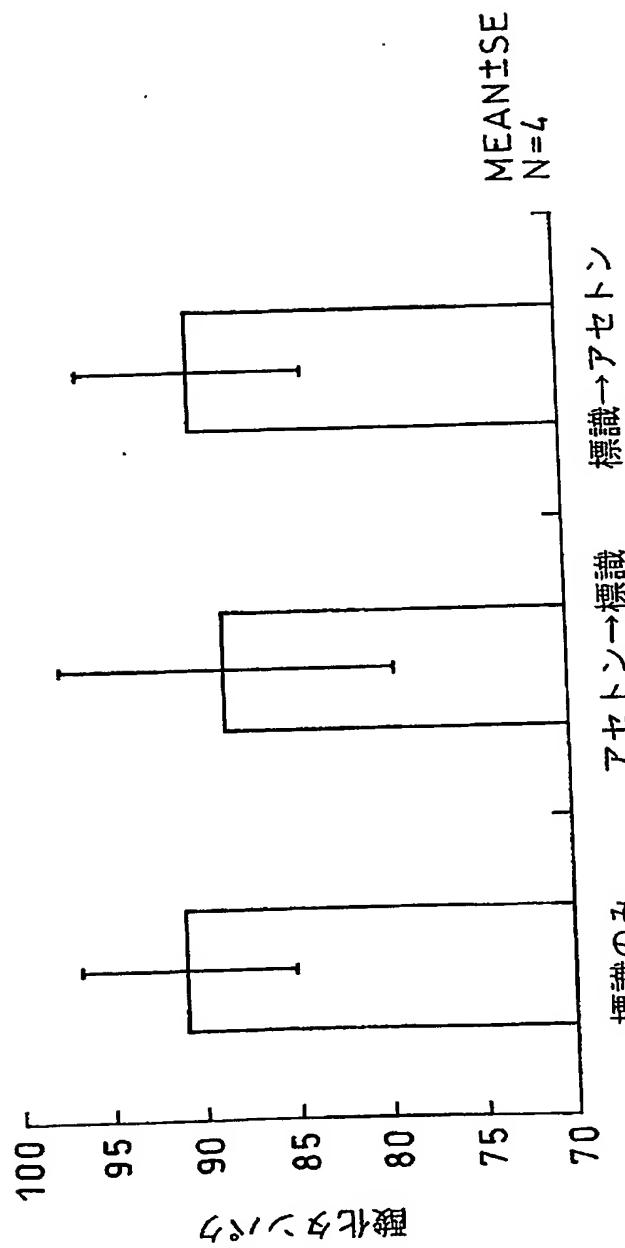


上腕内側



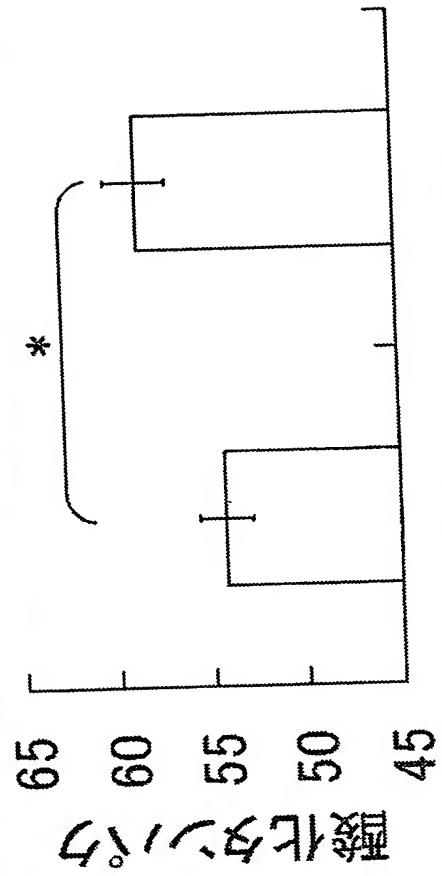
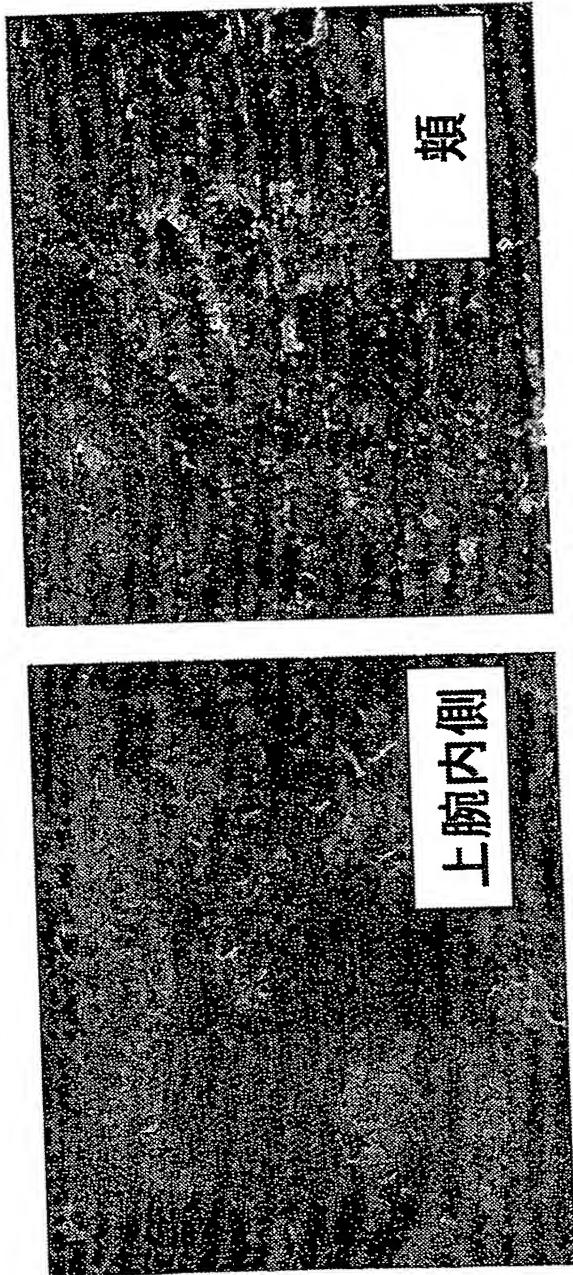
【図2】

図 2



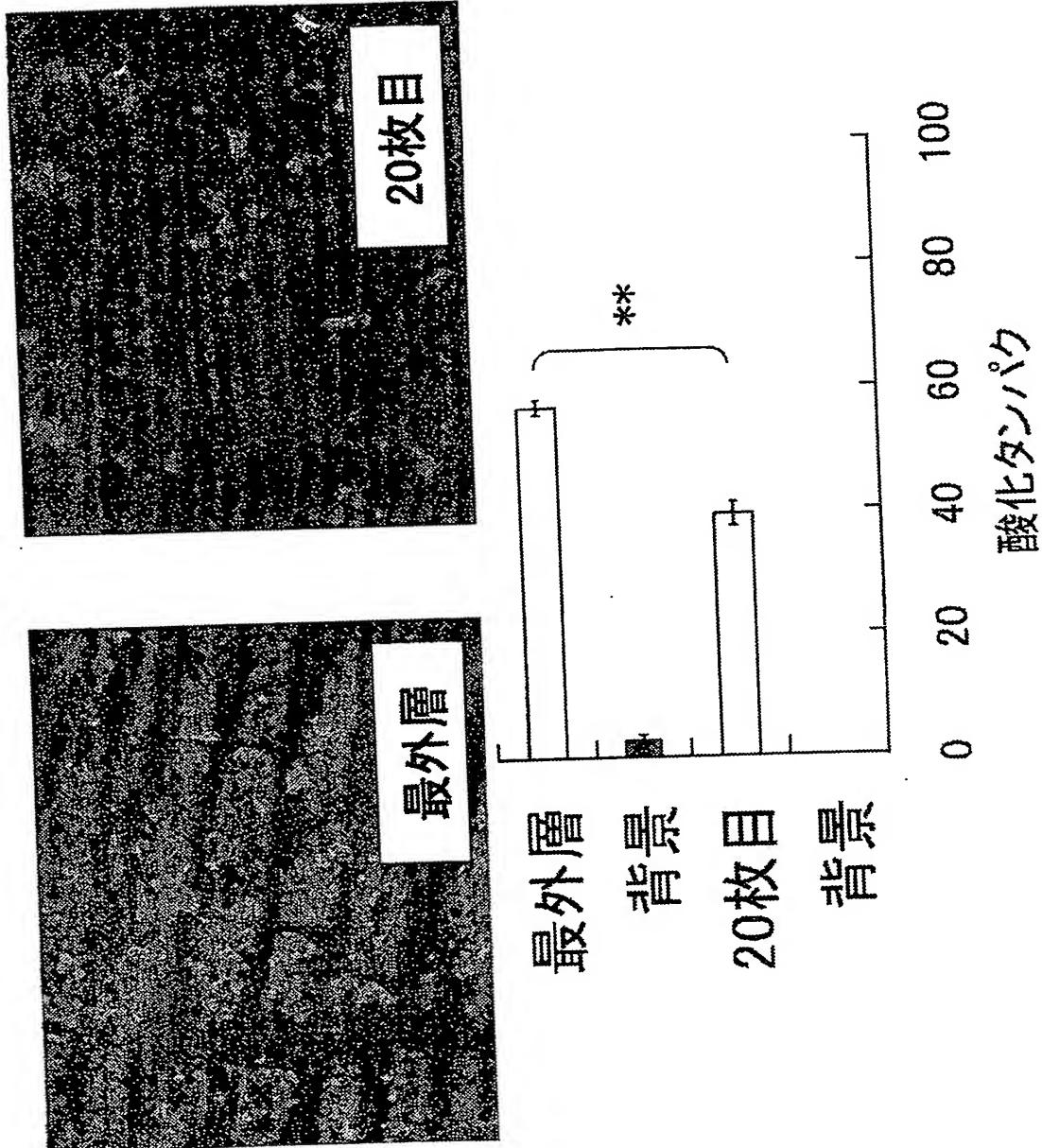
【図3】

図 3

頬
上腕内側

【図4】

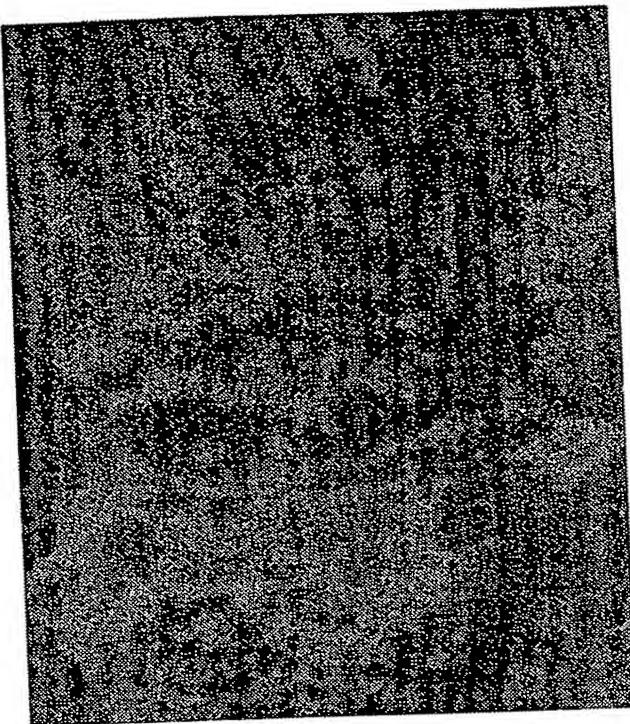
図 4



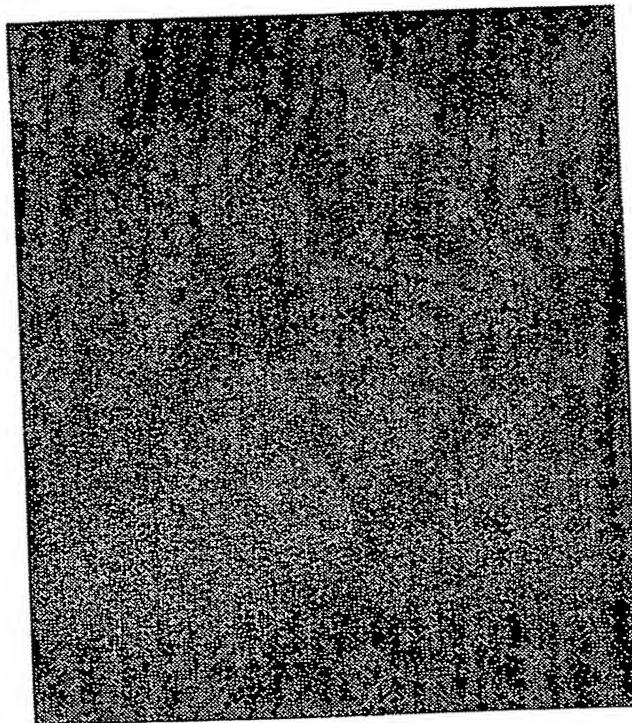
【図5】

図 5-

顔面

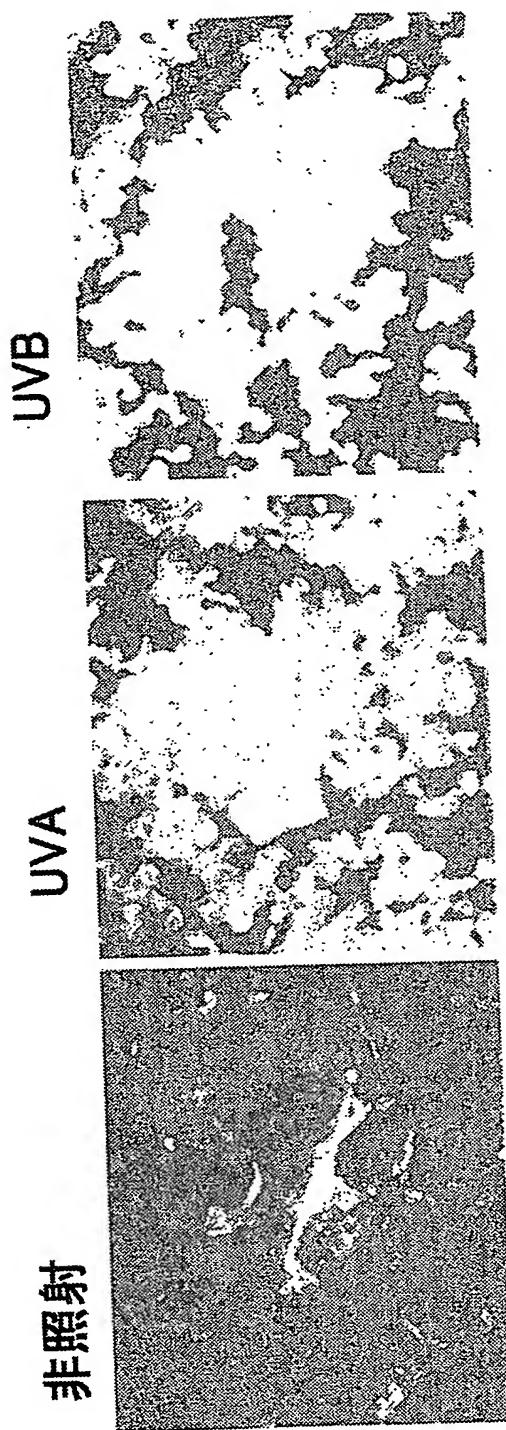


上腕内側



【図6】

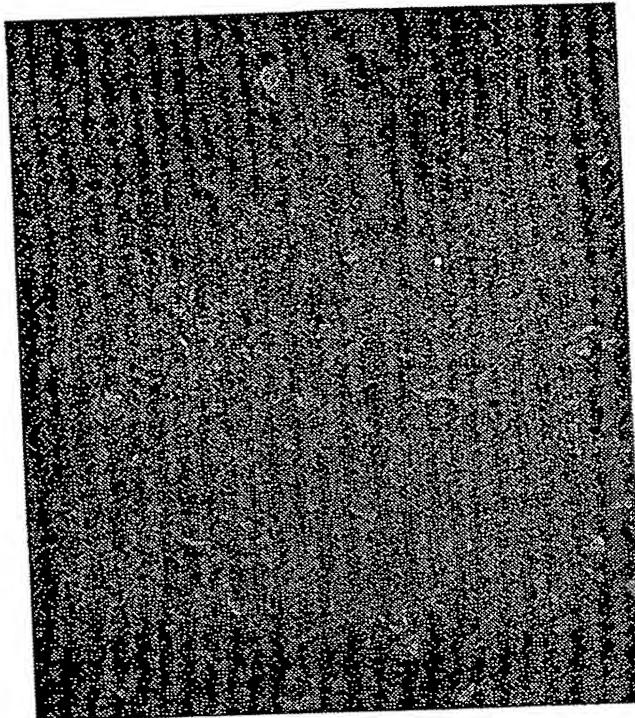
図 6



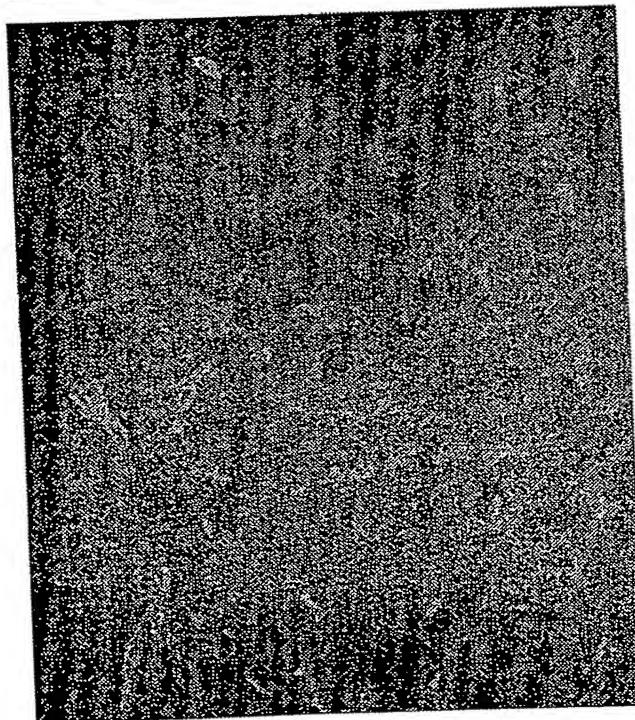
【図 7】

図 7

顔面



上腕内側



【図8】

図 8

顔面



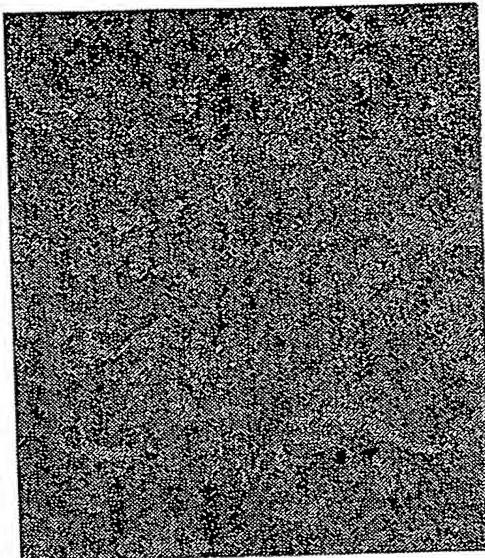
上腕内側



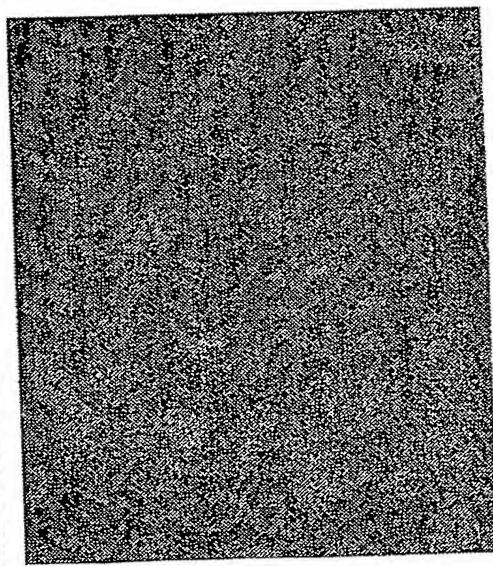
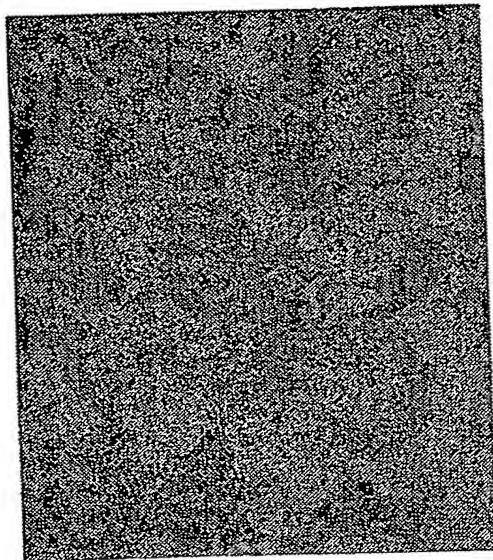
【図9】

図 9

顎面



上腕内側



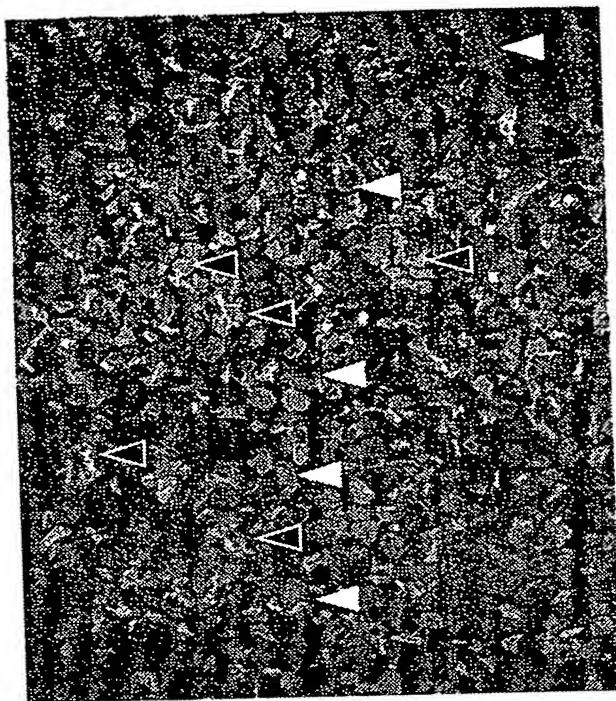
Involucrin

鱗化CE

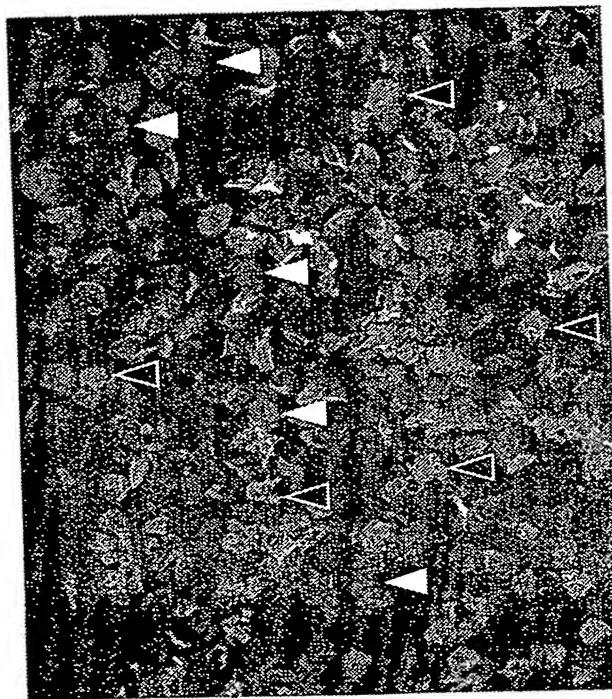
【図10】

図10

顎面



上腕内側



△ 酸化CE(黄緑色) △ 成熟CE(赤色)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 皮膚角質層の酸化タンパク質の皮膚上での性状の二次元的な情報を簡易に獲得し、特に化粧品等の販売の際のカウンセリングサービスにおけるかかる酸化タンパク質の情報の活用を図ること。

【解決手段】 本発明は、角層酸化タンパク質の角層上での性状を二次元的に評価する方法であって、皮膚から採取した角層試料中の当該酸化タンパク質のカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法、及びその方法を実施するために利用されるキットを提供する。本発明は更に、皮膚由来の角層試料における水不溶性物質であるコーニファイドエンベロープ（角質肥厚膜）の酸化形態を検出する方法であって、当該酸化形態のコーニファイドエンベロープにおけるカルボニル基を特異的に蛍光標識し、その蛍光を検出することで評価を行うことを特徴とする方法も提供する。

【選択図】 なし

特願 2003-116157

出願人履歴情報

識別番号

[000001959]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所
氏 名

1990年 8月27日

新規登録

東京都中央区銀座7丁目5番5号
株式会社資生堂

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.